

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号  
特表2002-535615  
(P2002-535615A)

(43) 公表日 平成14年10月22日 (2002. 10. 22)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

ターミナル\* (参考)

G 0 1 N 27/327  
27/416  
33/48  
33/483  
33/66

G 0 1 N 33/48  
33/483  
33/66  
27/30

H 2 G 0 4 5  
F  
C  
3 5 3 R  
3 5 3 J

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 37 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-593945 (P2000-593945)  
(86) (22) 出願日 平成12年1月11日 (2000. 1. 11)  
(85) 翻訳文提出日 平成13年7月12日 (2001. 7. 12)  
(86) 国際出願番号 PCT/US 00/00620  
(87) 国際公開番号 WO 00/42422  
(87) 国際公開日 平成12年7月20日 (2000. 7. 20)  
(31) 優先権主張番号 09/228, 855  
(32) 優先日 平成11年1月12日 (1999. 1. 12)  
(33) 優先権主張国 米国 (US)

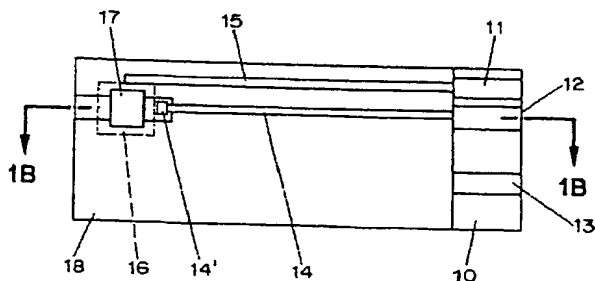
(71) 出願人 インバネス メディカル テクノロジー、  
インコーポレイテッド  
アメリカ合衆国、マサチューセッツ、ウォ  
ルサム、 プロスペクト ストリート  
200  
(72) 発明者 ムカリアー、ジェローム、エフ  
イギリス国 ウォンティッジ、ノーブルス  
クロース 52  
(72) 発明者 スコット デビッド  
イギリス国 オクソン、ウィットニイ、ニ  
ューランド ミル 68  
(74) 代理人 弁理士 浅村 皓 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 一体化した試薬/血液分離層を備えた使い捨て試験用細片

(57) 【要約】

本発明は、使い捨て試験用細片および患者からの血液試料を受容し、また充填剤、グルコースを酸化するのに有効な酵素、例えばグルコースオキシダーゼおよび電子を酵素から輸送するのに有効なメディエーターを含有する非導電性の一体化した試薬/血液分離層 (17) を用いる電気化学的分析を行う形式のテストメーターで使用するための改良された使い捨てグルコース試験用細片を提供する。この一体化した試薬/血液分離層は、導電性カーボン素子 (16) を覆って印刷し、作用電極を形成する。充填剤、例えばシリカ充填剤は、乾燥時に、導電性素子の表面上に二次元ネットワークが形成されるようなバランスの親水性を有するように選択する。この試験用細片からの応答は、関連温度範囲にわたり実質的に温度独立性であり、また患者のヘマトクリットに対して実質的に不感受性である。



**【特許請求の範囲】**

**【請求項1】** 使い捨て試験用細片および血液試料を受容し、試料中の血液アナライトの量の電気化学的分析を行う形式のテストメーターで用いられる使い捨て試験用細片であって、

- (a) 基体；
  - (b) 基体上に配置されている第一導電性素子；
  - (c) 基体上に、第一導電性素子に十分に近接して配置されている第二導電性素子であって、これにより血液試料が試験用細片上に置かれると、第一導電性素子と第二導電性素子との間の電気回路を完成させることができる第二導電性素子；
  - (d) 第一導電性素子を覆って配置されている非導電性の一体化した試薬／血液分離層であって、可溶性電気活性成分により第一導電性成分に接近することを可能にしながら、血液細胞を第一導電性素子の表面から排除するのに有効な非導電性マトリックス中に分散されているアナライトを電気化学的に検出するための試薬を含有する非導電性の一体化した試薬／血液分離層；
  - (e) 第一および第二導電性素子とテストメーターとの間を電氣的に接続するコンタクト；および
  - (f) 少なくとも第一導電性素子を覆って配置されており、第一導電性素子と整合している第一開口部をそこに有する絶縁層；
- を含み、ここで上記非導電性の一体化した試薬／血液分離層は絶縁層に存在する開口部を経て第一導電性素子と接触し、また上記非導電性の一体化した試薬／血液分離層は第一開口部全体を覆っており、これにより第一導電性素子の試験用細片に適用された試料に直接にさらされる部分が残らないようにされている、上記使い捨て試験用細片。

**【請求項2】** 一体化した試薬／血液分離層が、グルコース酸化酵素および電子を酵素から第一導電性素子に輸送するのに有効なレドックスメディエーターを含有する、請求項1に記載の試験用細片。

**【請求項3】** マトリックスが、疎水性表面と親水性表面との両方を有するシリカを含む、請求項2に記載の試験用細片。

**【請求項4】** 第一導電性素子および第二導電性素子が導電性カーボンを含

有する、請求項3に記載の試験用細片。

【請求項5】 酵素がグルコースオキシダーゼである、請求項4に記載の試験用細片。

【請求項6】 レドックスメディエーターが、フェリシアニドである、請求項5に記載の試験用細片。

【請求項7】 一体化した試薬／血液分離層が、結合剤2～10重量％；シリカ3～10重量％；レドックスメディエーター8～20重量％；および酵素1000～5000単位／水性組成物グラムを含有する水性組成物から形成されている、請求項3に記載の試験用細片。

【請求項8】 第一導電性素子および第二導電性素子が導電性カーボンを含有する、請求項7に記載の試験用細片。

【請求項9】 酵素がグルコースオキシダーゼである、請求項7に記載の試験用細片。

【請求項10】 レドックスメディエーターが、フェリシアニドである、請求項9に記載の試験用細片。

【請求項11】 使い捨て試験用細片および血液試料を受容し、試料中の血液アナライトの量の電気化学的分析を行う形式のテストメーターで用いられる使い捨て試験用細片の製造方法であって、

(a) 基体上に第一導電性素子および第二導電性素子を形成し；

(b) 第一導電性素子を覆う絶縁体の層を形成し、この絶縁体層は第一導電性素子の試料適用領域部分と整合している第一開口部をそこに有しており；次いで

(c) 絶縁層上に配置されており、絶縁層に存在する第一開口部を経て第一導電性素子と接触する試薬層を形成する；

工程を包含し、ここで上記一体化した試薬／血液分離層は、可溶性電気活性成分により第一導電性素子に接近することを可能にしながら、血液細胞を第一導電性素子の表面から排除するのに有効な非導電性マトリックス中に分散されているグルコースの電気化学的検出用試薬を含有し、これにより第一導電性素子が試験用細片に適用された試料への直接接触から分離される、  
上記製造方法。

【請求項12】 試薬層が、非導電性の一体化した試薬／血液分離層である、請求項11に記載の方法。

【請求項13】 非導電性の一体化した試薬／血液分離層を、第一開口部全体を覆って形成し、これにより第一導電性素子の試験用細片に適用された試料に直接にさらされる部分が残らないようにする、請求項12に記載の方法。

【請求項14】 一体化した試薬／血液分離層が、グルコース酸化用酵素および電子を酵素から第一導電性素子に輸送するのに有効なレドックスメディエーターを含有する、請求項13に記載の方法。

【請求項15】 マトリックスが、疎水性表面と親水性表面との両方を有するシリカを含む、請求項14に記載の方法。

【請求項16】 第一導電性素子および第二導電性素子が導電性カーボンを含有する、請求項15に記載の方法。

【請求項17】 酵素がグルコースオキシダーゼである、請求項16に記載の方法。

【請求項18】 レドックスメディエーターが、フェリシアニドである、請求項17に記載の方法。

【請求項19】 一体化した試薬／血液分離層を、結合剤2～10重量％；シリカ3～10重量％；レドックスメディエーター8～20重量％；および酵素1000～5000単位／水性組成物グラムを含有する水性組成物から形成する、請求項13に記載の方法。

【請求項20】 第一導電性素子および第二導電性素子が導電性カーボンを含有する、請求項19に記載の方法。

【請求項21】 酵素がグルコースオキシダーゼである、請求項19に記載の方法。

【請求項22】 レドックスメディエーターが、フェリシアニドである、請求項21に記載の方法。

【請求項23】 絶縁層を第一導電性素子および第二導電性素子の両方を覆って形成し、およびこの絶縁層は、第二導電性素子と整合している第二開口部を備えている、請求項13に記載の方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****(説明)****(発明の背景)**

本出願は、グルコースなどの血液アナライトの電気化学的測定に用いられる使い捨て試験用細片 (test strip) およびこのような細片の製造方法および製造用組成物に関する。

グルコースモニタリングは、糖尿病の人々の毎日の日常的仕事であり、このようなモニタリングの精度は、生と死との間の差を実際的に意味することができる。グルコースレベルの頻繁なモニタリングの必要性に通常的生活スタイルを順応させるために、現在、多くのグルコースメーターを利用することができ、これにより個人が少量の血液中のグルコースレベルを試験することが可能にされている。

**【0002】**

これらのメーターの多くは、一回使用の電極システムの一部として付与されている酵素、例えばグルコースオキシダーゼを用いる血液中のグルコースの酸化により、血液試料中のグルコースを電気化学的に検出するものである。この形式のデバイスの例は、欧州特許No. 0127958および米国特許No. 5, 141, 868、同No. 5, 286, 362、同No. 5, 288, 636および同No. 5, 437, 999に記載されており、これらの記載をこのような組み入れを許可するこれらの国々の目的にかかわり引用して、ここに組み入れる。

**【0003】**

一般に、電気化学的測定に用いられる現存のグルコース試験用細片は、基体、この基体の表面上に形成された作用電極および対照電極、およびメーターを包含する。作用電極は、グルコースを酸化することができる酵素およびグルコースが存在する場合、酵素から電極に電子を輸送し測定可能な電流を生成するメディエーター化合物で被覆されている。代表的メディエーター化合物は、フェリシアニド、メタロセン化合物、例えばフェロセン、キノン類、フェナジニウム塩、レドックス指示薬DCPIPおよびイミダゾール置換オスミウム化合物を包含する。

## 【0004】

この種の作用電極は、多くの方法で製造することができる。例えば、導電性カーボン、グルコースオキシダーゼおよびメディエーターの混合物を、ペースト状またはインキ状に調製し、次いで基体に適用する。EP 0127958およびUS5, 286, 362。使い捨てグルコース細片の場合、小型の薄い試験用細片に適する薄膜を得るために、この適用はスクリーン印刷によって行われる。しかしながら、スクリーン印刷の使用は、電極動作に問題をもたらす。

## 【0005】

測定期間中、堅く接着したままで濃厚なカーボンペースト電極とは異なり、カーボンペーストまたはインキから形成されているスクリーン印刷された電極は、試料との接触に際して、破壊されることが証明された。この破壊の結果は、2重である。第一に、電極組成物の成分が溶液中に放出される。これらの成分が、その下に存在する電極層から拡散距離よりも離れて一度移動すると、これらの成分はもはや測定に寄与することができず、むしろ実際には、内部に向かって拡散するアナライトの枯渇による応答を減少させる。第二に、スクリーン印刷された電極の破壊は、有効電極面積が経過時間にわたり低下することを意味する。

## 【0006】

これら二つの作用の組み合わせにより、電流過渡 (current transient) の測定期間中にわたる初期ピークからの急速な低下および酵素用メディエーターと急速に競合する酸素に対する高感受性が生じる。この事実は、血液試料で測定された電流が血漿試料または他の水性媒質で測定された電流に比較して少ないことによって明白に証明され、またこの事実は読み取り誤差をもたらすことができる。これに引き続いて、この過渡はしばしば、電極が無秩序の様相で破壊される結果として、「不揃い」 (lumpy) になる。この不揃いの過渡電流は、誤った読みを生じさせるか、または細片拒絶を生じさせ、これらはどちらも、許容できるものではない。

## 【0007】

スクリーン印刷されたカーボンを基材とする電極の電極破壊にかかわる問題に加えて、使い捨てグルコース試験用細片に用いられる公知電極は、動態的に制御

されるものである。すなわち、その電流は酵素によるグルコースの変換速度に依存する。メーターにより測定される応答は、酵素とメディエーターとの間の反応、酵素とグルコースとの反応および酵素と酸素との反応の間の平衡を表わすことから、またこれらの反応はそれぞれ、それ自体が温度に依存することから、動的に制御される試験用細片の応答は、試料温度に対して非常に敏感である。測定されたグルコース値における実質的な差異が試料の取り扱いの相違の結果として生じることがある。

#### 【0008】

電気化学的グルコース検出用センサーが直面するもう一つの挑戦は、試料中に存在する血液細胞からの干渉の結果として生じる。赤血球レベルは、ヘマトクリットの読みに反映する。代表的に、高ヘマトクリット試料は、真正値よりも低い読みをもたらし、他方で、低ヘマトクリット試料は、この血液細胞が電極表面を汚し、電子輸送を制限する傾向を有することから、真正値よりも高い読みをもたらす。また、赤血球のヘモグロビンに結合した酸素は、還元酵素に対するメディエーターと競合し、これによりグルコース応答をさらに減少させる。血液成分を濾別するために、膜を付加することによってヘマトクリット作用を制限することが試みられている（米国特許No. 5, 658, 444参照、これらの記載をこのような組み入れを許可するこれらの国々の目的にかかわり引用して、ここに組み入れる）。しかしながら、この方法は製造方法に追加の工程を付加し、従って価格を高め、また精度などの別の観点でもしばしば、性能を悪化させる。

#### 【0009】

メーターおよび使い捨て試験用細片を用いる患者の福利に対応して正確なグルコース値を得ることは重要なことであることから、これらの欠点を被ることなく、従って実施条件に関係なく、実際の血液中グルコース値の高い一貫性および信頼できる指示を提供するグルコース試験用細片を得ることが非常に望まれている。従って、本発明の目的は、試料中のヘマトクリットから実質的に独立している読みを提供し、また一体化した試薬／血液分離層を備えている使い捨てグルコース試験用細片を提供することにある。

本発明のもう一つの目的は、使い捨てグルコース試験用細片の改良された製造

方法を提供することにある。

【0010】

(発明の要旨)

本発明は、使い捨て試験用細片および患者からの血液試料を受容し、試料中のグルコースなどの血液アナライトの量の電気化学的分析を行う形式のテストメーターで用いられる使い捨て試験用細片を提供する。この試験用細片は、

- (a) 基体；
  - (b) 基体上に配置されている第一導電性素子；
  - (c) 基体上に、第一導電性素子に十分に近接して配置されている第二導電性素子であって、これにより血液試料が試験用細片上に配置されると、第一導電性素子と第二導電性素子との間の電気回路を完成させることができる第二導電性素子；
  - (d) 第一導電性素子を覆って配置されている非導電性の一体化した試薬／血液分離層；および
  - (e) 第一および第二導電性素子とテストメーターとの間を電氣的に接続するコンタクト；
- を備えている。

【0011】

この一体化した試薬／血液分離層は、可溶性電気活性成分により第一導電性素子に接近することを可能にしながら、血液細胞を第一導電性素子の表面から排除するのに有効な非導電性マトリックス中に分散されているアナライトの電気化学的検出用の試薬を含有する。本発明の一態様において、グルコース試験用細片は、疎水性表面領域と親水性表面領域との両方を有する充填剤、グルコース酸化用酵素、例えばグルコースオキシダーゼおよび電子を酵素から第一導電性素子に輸送するのに有効なメディエーターを備えている。この充填剤は、乾燥すると、一体化した試薬／血液分離層が導電性素子の表面上で二次元ネットワークを形成するような疎水性と親水性とのバランスを有するように選択する。好適な一体化した試薬／血液分離層は、ヒドロキシエチルセルロース（HEC）などの材料と組み合わせられている非導電性シリカ充填剤を含有する。シリカおよびHECは、赤血球



細胞を排除する二次元ネットワークを形成し、従って当該試験用細片を患者のヘマトクリットに対して実質的に不感受性にする。

#### 【0012】

本発明の好適態様において、この試験用細片は、少なくとも第一導電性素子全体を覆って配置されている絶縁層を備えて製造される。この絶縁層は、第一導電性素子と整合するように形成されている第一開口部をそこに有しており、また一体化した試薬／血液分離層がこの開口部を経て第一導電性素子と接触するように配置されている。

#### 【0013】

(発明の詳細な説明)

図1Aおよび1Bには、本発明による使い捨て試験用細片に有用な電極が示されている。図示されているように、この電極は基体10上に形成される。基体10上に、2種の導電性素子14'および16を配置し、これらの素子を導線14および15により導電性コンタクト11、12および13に接続する。次いで、絶縁層18を形成し、導電性素子14'および16の少なくとも一部分を残し、またコンタクト11、12および13が露出されるようにする。次いで、非導電性の一体化した試薬／血液分離層17を絶縁マスク18全体上に適用し、コンタクトを導電性素子16と接触させる。

#### 【0014】

図1に示されている構造体は、メーターに接続した場合、血液アナライターの測定に対して十分に機能する組立て装置を提供する。しかしながら、有利には、本発明による細片状電極は、一体化した試薬／血液分離層17の位置により定められる電極構造体22の試料適用領域全体を覆ってナイロンまたはポリエステルメッシュを適用することにより、および次いで血液試料の放散を防止するためのトップカバー23を適用することにより仕上げられている(図2)。このポリエステルメッシュは、試料を対照電極、導電性素子14'に導くために作用し、これにより当該デバイスが始動され、試験が開始される。

#### 【0015】

非導電性の一体化した試薬／血液分離層を使用することによって、試薬の印刷

に導電性試薬含有スラリーを用いる公知試験用細片との重要な相違点が付与され、また公知試験用細片に優る利点が得られる。これらのシステムにおいて、印刷されたスラリーは、電極の機能的部分になり、電荷移送を試薬層の外側表面で生じる。この層が血液と直接接触すると、すなわち介在する分離層が配置されていないと、赤血球細胞および白血球細胞、脂肪および試料中に存在する成分が試薬層と相互反応し、試料中のアナライトの量の測定が干渉される。

#### 【0016】

これに対して、本発明において、一体化した試薬／血液分離層は非導電性であり、従って構造的にも、または機能的にも、電極の一部ではない。電気活性成分が一体化した試薬／血液分離層の開口部／孔を通過し、その下に存在する導電性素子に到達しないかぎり、電荷移送は生じない。従って、この一体化した試薬／血液分離層は細胞および巨大分子などの干渉物質の通過に対する障壁を提供し、優れた性能を有するデバイスをより簡単なものにする結果をもたらす。

#### 【0017】

この結果を達成するためには、試料を試料適用領域に配置した場合、導電性素子16の一部が試料にさらされないような様相で、一体化した試薬／血液分離層を配置することが特に望ましい。導電性素子14'および16を横切って付与されている開口部を備えた絶縁層を用いる上記方法は、この結果の達成に特に適している。従って、図9A～9Cに示されているように、この方法は、3工程のみで試験用細片の形成を可能にする。第一工程において（図9A）、2個の導電性素子14'および16および付随する導線およびコンタクトを基体上に設置する。第二工程において（図9B）、絶縁性材料の層を導電性素子全体を覆って沈着させる。この絶縁性材料は2個の孔94および96を有し、その一方は導電性素子14'および16とそれぞれ整合させる。第三工程において（図9C）、一体化した試薬／血液分離層17を孔96を覆って配置する。この配置された層17を孔96よりも大きくすることによって、試料が導電性素子にさらされないようにされ、試薬層がその下の導電性素子を完全に覆い、これにより効果的な血液分離が得られる。

#### 【0018】

導電性素子の完全被覆はまた、電気化学的酸化の結果として、または試料中に存在することがあるアスコルビン酸、尿酸およびアセトアミノフェンなどの小型分子により生じることがある、もう一つの誤認原を提供する。存在する場合、電極表面におけるこれらの分子の酸化は、見せかけの電流レベル上昇を導き、所望のアナライト、例えばグルコースの不正確な測定値をもたらす。本発明による一体化した試薬／血液分離層は一般に、これらの分子が見出される孔寸法に比較して小さいことから、これらの分子を排除する。しかしながら、この一体化した試薬／血液分離層にpH緩衝剤を包含させることによって、電極表面の局所pHを、これらの成分の電気化学的電力がより高いレベルにまで移動させることができる。従って、一例として、そのpHがpH5付近のレベルに緩衝されている一体化した試薬／血液分離層を用いると、これらの干渉による衝撃が実質的に減少される。しかしながら、露出されている（緩衝されていない）電極表面の面積が比較的小さくても、大量の干渉電流が生じることがあることから、この緩衝効果を最大にするためには、導電性素子全体を被覆しなければならない。

#### 【0019】

本発明の試験用細片は、血液試料からの導電性素子の分離をもたらす性能上の利点を提供するばかりでなく、また本発明の試験用細片は別の誤差発生原に対する抵抗性を有する。一例として、試験期間中、試薬は元の貯蔵槽から横方向に拡散放出されることがある。試薬層を導電性素子に直接に沈着させることによって、これらの試薬は測定信号に関与し続ける。試験毎との伝達変化（例えば、デバイスの取り扱いにおける変化または温度の相違の結果として生じる）にかかわる全ての変化は非再現性の信号として現れる。しかしながら、試薬層を絶縁印刷物で覆うと、孔からの横方向拡散放出は、信号に関与せず、従って信号の変化は生じないものと見做される。

#### 【0020】

有利な性質を有する試験用細片を提供することに加えて、図9A～Cに概略が示されている方法は、その製造法からも数種の利点をもたらす。第一に、試薬層を導電性素子上に直接に印刷した場合、「活性面積」は、試薬層の面積により定められる。従って、試験の精度は、試薬層を印刷することができる精度により決

定される。これに対して、試薬層とその下の導電性素子との間の接触領域を定める有孔絶縁層を最初に沈着させることによって、活性面積は絶縁層に存在する孔の寸法により定められる。絶縁層は代表的に、微細スクリーンを用いて印刷されることから、縁端限定がより良好になり、従ってより大きいデバイス精度を得ることができる。すなわち、最終試験用細片の性能上の特性にかかわり、導電性素子16の面積も、また一体化した試薬／血液分離層の面積も、臨界的ではなくなる。従って、導電性素子および一体化した試薬／血液分離層は、別の方法で用いることができるよりも精度の低い技術を用いる場合にも、使用することができる。

#### 【0021】

当業者にとって明白なように、両方の導電性素子は、試料適用領域に配置された試料中の電気活性成分を需要することができなければならないばかりでなく、また絶縁マスクの重要な機能は、導電性素子16と一体化した試薬／血液分離層17との間の接触領域を明確に規定することにある。すなわち、制限しようとする場合、絶縁層に1個の孔を形成する必要があるのみである。第二導電性素子は、絶縁層の縁端に沿って露出させることができ、または重ねられた電極構造体と対面させて位置させることもできる。

#### 【0022】

本発明による試験用細片の製造に用いられる基体10は、グルコーステストメーターに挿入するのに適する全部の非導電性で寸法的に安定な材料であることができる。適当な材料には、ポリエステル薄膜、例えば330ミクロンのポリエステル薄膜、およびその他の絶縁性基体材料、例えばポリビニルクロライド(PVC)およびポリカーボネートが包含される。

#### 【0023】

導電性素子および付随する導線およびコンタクトは、銀、 $Ag/AgCl$ 、金またはプラチナ／カーボンを含むいずれかの導電性材料から形成することができる、これら全部を同一材料から製造する必要はない。導電性素子16は好ましくは、導電性カーボンから形成される。好適導電性カーボンは、ERCON ERC1, ERCON ERC2 およびアチェソンカーボンエレクトロダグ(Acheson Carbon Electrode)

g) 423 である。これらの仕様を有するカーボンは、エルコン社 [Ercon Inc. (Waltham, Massachusetts, USA)] またはアチェソンコロイド社 [Acheson Colloids (Princes Rock, Plymouth, England)] から入手することができる。導電性素子 16 は、作用電極トラック 15 と接触させ、次いでそこを閉鎖させるが、対照電極トラック 14 の末端として設置される導電性素子とは接触させない。

#### 【0024】

絶縁層 18 は、ポリエステルを基材とする印刷可能な誘電性材料、例えば ERCON R488-B (HV) -B2 ブルーから形成することができる。トップカバー 23 は、ポリエステル片からまたは「ホットメルト」被覆プラスチックから適当に形成することができる。

本発明による試験用細片は、試料が電極室に入るのに従いデバイスからの空気の排除を可能にする分離した出口開口部を形成する必要はないが、その代わりに、メッシュの縁端全体に沿って分布している出口を用いることができる。試料流体がメッシュに沿って弾かれるに従い、空気は最上層の下側のデバイス全体を取り囲むメッシュの縁端から滲出する。試料流体は、絶縁層がメッシュの一部に格別の疎水性を付与することから、滲出しない。従って、液状試料は中央の親水性領域にとどまる。

#### 【0025】

本発明を用いて達成される性能の鍵は、一体化した試薬／血液分離層の性質にある。この層は、疎水性表面と親水性表面との両方を有する充填剤を含有し、またグルコース試験用細片の場合、グルコースを酸化することができる酵素および酵素からその下の導電性素子層 16 に電子を輸送することができるメディエーターを含有する混合物から形成することができる。この層は、充填剤、酵素およびメディエーターを適当な担体中に含有するインキを形成し、このインキを用いて、当該デバイス上に層 17 を印刷する。

#### 【0026】

層 17 に用いるのに好適な充填剤は、シリカである。シリカは、種々の等級で、また種々の表面修飾をもって入手することができる。試験された全部のシリカ化合物が、或る条件下にグルコースを測定することができる生成物をもたらすが

、本発明のグルコース試験用細片の優れた性能特性は、これを部分的に疎水性にする表面修飾を有するシリカを用いた場合に得られる。この種の材料には、Cab-O-Si TS610（これは、メチルジクロロシランで部分的に表面処理されたシリカである）、Cab-O-Sil 530（これは、ヘキサメチルジシラザンで完全に表面処理することによって修飾されたシリカである）、スフェリソルブ（Spherisorb）C4シリカ（これは、4炭素鎖で表面修飾されたシリカである）およびその他の類似の修飾されたシリカまたはその組合わせが包含される。過度に疎水性である表面修飾を有するシリカは回避すべきである。例えば、C18修飾シリカは、印刷可能なインキの形成には疎水性過ぎることが見出された。

#### 【0027】

本発明のインキの製造操作中、粒子はホモジネーションにより分解され、シリカ粒子の親水性内部部分が露出される。従って、インキ中に実際に存在する粒子は、疎水性領域と親水性領域との両方を有する。この親水性領域は、相互に、および水と水素結合を形成する。

#### 【0028】

例1で下述するように、この材料をインキ中に配合し、導電性素子16上にスクリーン印刷すると、この材料の二重の性質が、この二つに二次元ネットワークの層を形成させる。このネットワークは、顕微鏡検査で見ることができる蜂の巣状体として形成される。再水和させると、この層は分解しないが、膨潤して、その下に存在する導電性素子16付近にゲル化した反応帯域を形成する。酵素、メディエーターおよびグルコースなどの反応は、この帯域内で自由に移動するが、酸化されたヘモグロビンを含む赤血球細胞などの干渉成分は排除される。この結果として、一定量のグルコースに対する応答で生じる電流の量が、40～60%のヘマトクリット範囲にわたり10パーセントよりも少なく変化し、従って、試料がヘマトクリットに対して実質的に不感受性であり、また細胞を含有していない対照溶液におけるのと実質的に同様の性能が血液で得られるデバイスが得られる（図3A～C、図4および図5A～5C）。

#### 【0029】

さらにまた、ゲル化した反応帯域は、動態的に制限されるというよりは、むしろ

る当該デバイスを拡散するグルコースなどの血液アナライトの流入に対するより大きい障壁を提供する。これは、測定された電流が20℃～37℃の温度範囲にわたり10パーセントよりも少なく変化し、また実質的に温度独立性であるデバイスを導く（図6Aおよび6B）。

#### 【0030】

グルコース試験用細片を製造する場合、一体化した試薬／血液分離層は、ヒドロキシエチルセルロースまたはヒドロキシエチルセルロースとアルギネートもしくはその他の増量剤との混合物などの結合剤を、2～10重量%、好ましくは4～10重量%、さらに好ましくは約4.5重量%の量で、シリカを3～10重量%、好ましくは3～5重量%、さらに好ましくは約4重量%の量で、フェリシアニドなどのメディエーターを8～20重量%、好ましくは14～18重量%、さらに好ましくは約16重量%の量で、およびグルコースオキシダーゼなどの酵素を0.4～2重量%、好ましくは1～2重量%、さらに好ましくは約1.6重量%の量（この量は、約250単位／mgの比活性またはインキ組成物1gあたり約1000～5000単位／mgに相当する）で含有する。

#### 【0031】

一体化した試薬／血液分離層はまた、本発明の範囲から逸脱することなく、追加の成分を含有することができる。一例として、非導電性層は、発泡防止剤を含有することができる。さらに、非導電性層は、反応帯域のpHを制御するために、緩衝剤を用いて組成することができる。このpHは、約pH3からpH10までの範囲内のレベルに維持することができる。本発明の一態様において、デバイスのpHを8以上のレベルに維持すると、特に有利であり、これはこのpHにおいて、ヘモグロビンに結合した酸素が放出されないからである。さらに、このpHにおいて、グルコースオキシダーゼと酸素との反応は、非常に遅い。従って、適当なpHの選択は、変化するヘマトクリット的作用に対する当該試験用細片の性能をさらに安定化する。本発明の別の態様において、低pHの維持が好適であることもある（pH5.5以下、このpHはグルコースオキシダーゼと酸素との反応にとって最適pHである）。例えば、アスコルビン酸、尿酸またはアセトアミノフェンなどの干渉物質の酸化から生じる電気化学的干渉を排除することが主

目的である場合、pHをpH5に維持すると好ましい。この理由は、これらの化合物が低pHでは酸化させることがより困難であるからである。

#### 【0032】

本発明の好適態様は、上記のグルコース試験用細片であるが、本発明の試験用細片はグルコースの検出に制限されるものではない。例えば、フラクトサミン試験用細片は、導電性素子上に配置されている2枚の層を含んでいる。第一の下方の層は、例7に実質的に記載されているようなシリカマトリックス中にカーボネート緩衝剤(pH>10)を含有するが、酵素、メディエーターまたはクエン酸塩緩衝剤を含有していないインキから形成する。第二の上方の層は、フェリシアニドなどの酸化剤をさらに含有するインキから形成する。

#### 【0033】

図7は、本発明のもう一つの態様を示している。この態様においては、第二の非導電性層71を、一体化した試薬／血液分離層17上に配置する。この層は、酵素または酵素とメディエーターの両方が省略されている以外は第一の一体化した試薬／血液分離層と同一である組成物から形成する。この層はまた、導電性層16を酸素担持赤血球細胞との接触から分離し、これにより酸素の作用が減少される。さらにまた、酵素が測定中に電極の表面から離れて分散される傾向を有することができる程度にまで、このようなメディエーター含有層の電子輸送に利用することができるメディエーター含有領域を増加させることができる。

#### 【0034】

##### 例1

一体化した試薬／血液分離層17を製造するための非導電性組成物を、下記のとおりにして製造した。20mM水性クエン酸三ナトリウム100mlのpHを、0.1Mクエン酸の添加により、pH6に調整した。ここに、ヒドロキシエチルセルロース(HEC)6gを添加し、次いでホモジネーションにより混合した。この混合物を一夜にわたり放置し、空気泡を分散させ、次いでコーティング組成物形成用の原料溶液として使用した。

このHB溶液50gに、Cab-o-Sil TS610 シリカ2gおよびダウコーニング(Dow Corning)発泡防止化合物0.1gを、手で攪拌しながら全量の4/5が添加され



るまで徐々に添加した。残りはホモジネーションによる混合によって添加した。この混合物を次いで、冷凍庫内で10分間冷却させた。次いで、カリウムヘキサシアノフェレート(III) 8gを添加し、完全に溶解するまで混合した。最後に、グルコースオキシダーゼ酵素製剤0.8g(250単位/mg)を添加し、次いで溶液中に十分に混合した。生成する組成物は印刷用に整えられており、または冷蔵して保存することができる。

#### 【0035】

##### 例2

例1のインキ組成物を用いてグルコース試験用細片を製造するために、一連の組み合わせを用いて、330ミクロンのポリエステル基体[メリネックス(Melinex) 329]上に層をスクリーン印刷した。この第一工程は、カーボンパッドの印刷である。カーボンの10X50パッドのアレーを、EC2カーボン[エルコン(Ercon)]を用いる印刷によりポリエステル基体の表面上に形成する。この印刷された基体を次いで、加熱ドライヤーに通し、次いで所望により、高められた温度(例えば、70℃)で1~3週間かけて硬化させる。

次いで、銀/塩化銀接続トラックおよびコンタクトのアレーを、ERCON R-414(DPM-68) 1.25バイオ電極センサーコーティング材料を用いて基体上に印刷し、次いで乾燥させる。アレーの各カーボンパッド毎に、カーボンパッドと接触させる1個の作用トラックおよび1個の対照トラックを印刷する。

#### 【0036】

誘電体層を次いで、ERCON R-488-B(HV)-B2ブルーを用いて印刷し、次いで乾燥させる。この誘電体層は、各デバイスの実質的に全体を覆い、未被覆のコンタクト、対照電極の最上面およびカーボンパッドのみを残す。

この誘電体層の最上面上に、例1のインキを用いて、各導電性カーボンパッドの最上面上に積層されている一体化した試薬/血液分離層を形成する。

ポリエステルメッシュ細片[スクリネル(Scrynel) PET230HC]を次いで、基体を横切る列の状態で形成し、この誘電体の窓により露出されている反応領域を覆う。5mm幅のポリエステル細片(厚さ50ミクロン)を次いで、このメッシュ細片の最上面上に適用し、次いで電極の縁端を熱シールする。最後に、基体を切り

、例えば幅5.5mmおよび長さ30mmの大きさを有する50個の電極を得る。

【0037】

### 例3

例2に記載の方法で例1のインキ組成物を用いて製造された試験用細片を、500mVの適用電圧を備えたテストメーターに配置し、種々のグルコース濃度および40%~60%の範囲のヘマトクリットを含有する血液試料の試験に使用した。図3A~3Cは、電圧適用後の25秒の時点で測定された電流をグルコース濃度の関数として示しており、また図4は、グルコースの応答の勾配をヘマトクリットの関数として示すグラフである。この図面から見るように、この指示体は、ヘマトクリットとは基本的に無関係に高度の応答性を有する電流レベルを生じる。

【0038】

### 例4

本発明によるグルコース試験用細片を、例2に従い製造したが、スフェリソルブ(Spherisorb) C4 7gGおよびCab-o-Sil TS610を用いて非導電性層を形成した。この組成物を下記の3種の相違する種類のカーボン含有導電性素子上に設置した：

A. エルコン(Ercon) EC1

B. エルコン(Ercon) EC2

C. アчесオンカーボン、エレクトロダグ(Acheson Carbon, Electrodag) 423SSの最上面上のエルコン(Ercon) EC2。

これらの試験用細片を用いて、不活性溶液中にグルコースを含有する対照溶液(One Touch Control Solution, Lifescan Inc.) または血液中にグルコースを含有する溶液中の種々のレベルのグルコースを、425mVで測定した。電圧印加後の25秒の時点で得られた電流を測定した。図5A~5Cに、3種の組成物A、BおよびCについて得られた結果をそれぞれ示す。全部の場合、グルコース濃度の相違に対するテストメーターの応答を示すラインの勾配は、測定が血液に対して行われたか、または対照溶液に対して行われたかにかかわらず、実質的に同一であった。すなわち、これは本発明による試験用細片の試料中の酸素含有量およ

びヘマトクリットからの独立性、ならびに導電性素子として種々の材料を使用することができることを、さらに証明している。

【0039】

#### 例5

例2に従い製造された試験用細片を、2種の相違する試料温度、すなわち37℃および20℃において、425mVの印加電圧を用いて試験した。図6Aおよび6Bは、電圧印加後の25秒の時点で測定された電流をグルコース濃度の関数として示している。見ることができるように、2本のラインの勾配は、実質的に同一である（20℃において0.1068対37℃において0.1009）。すなわち、これは当該試験用細片が生理学的温度に近い温度からの温度範囲にわたり実質的に温度－独立性挙動を示すことを証明している。

【0040】

#### 例6

例2に従い製造された試験用細片およびカーボン含有インキを用いて製造された市販の試験用細片について、電流過渡を測定した。この結果を図8Aおよび8Bに示す。示されているように、本発明による試験用細片（図8A）は、試験用細片からの初期応答後の25秒よりも長い期間にわたりピーク電流の50%以上を維持する非常に平坦な電流過渡を提供する。これに反して、カーボンを基材とする電極は、電流のほとんど即時の減衰を示し、試験用細片からの初期応答後の1～2秒の間にピーク電流の50%を失う。これは、ピーク電流値を獲得しなければならない場合に測定を困難にするか、または実質的減衰が生じた後に電流を測定しなければならない場合に、メーターの動作範囲を減少させる。従って、本発明による試験用細片は、一定量のグルコースに対する応答により生じる電流が、ピーク電流発生後の5秒の時点で50%より少なく減衰する。

【0041】

#### 例7

本発明によるグルコース試験用細片印刷用インキを下記の通りに調合した：

20mMクエン酸緩衝剤（pH6）67.8g

ポリビニルアルコール0.68g（MW:85,000～146,000、88%加水分解）

ポリビニルピロリドンービニルアセテート0.68g  
ダウコーニング (Dow Corning) DC1500発泡防止剤0.42g  
ヒドロキシエチルセルロース3.4g [ナトロゾル (Natrosol) 250G, Hercules]  
]

表面修飾シリカ5.5g (Cabo-Sil TS610, Cabot)

グルコースオキシダーゼ1.5g

カリウムフェリシアニド20.0g

【0042】

#### 例8

図10A~10Iは、本発明による試験用細片の段階的製造を示している。この試験用細片と図1の試験用細片との比較から明白なように、細片上の電極の正確な配列は臨界的ではない。さらに、相違する材料を細片の形成に使用することができる。

この試験用細片を形成する第一工程は、基体100の銀トラック101, 102の沈着である。好適基体は、バロックス (Valox) (登録商標) の商品名で販売されている500ミクロン厚さのポリエステル薄膜である。この銀電極は、例2で調合されたインキ組成物を用いるスクリーン印刷によって形成することができる。

【0043】

銀電極の沈着後、第二電極の印刷を行い、図10Bに示されているようにカーボン導電性素子103, 104および105を形成する。導電性素子103は、銀トラック101と接触して形成し、次いで最終試験用細片に作用電極を形成する。カーボンパッド104および105を、銀トラック101および102の末端と電氣的に接続し、当該細片とテストメーターとの間を接続させる。このカーボン導電性素子は、前記例に記載されているとおりに、導電性カーボンインキ組成物を用いるスクリーン印刷によって形成することができる。

【0044】

製造方法の第二工程は、例えば例2の誘電体のような絶縁性インキのスクリーン印刷による絶縁層106の沈着である(図10C)。図示されているように、

この絶縁層は3個の窓107, 108, および109を備えている。窓108は、カーボン導電性素子103の末端と整合している。窓107は、銀トラック102の末端と整合し、対照電極への接近をもたらす。第三の窓109は、第二絶縁性コーティングからメッシュ層を通る絶縁性材料の通過可能性を提供するが、不可欠ではない。

#### 【0045】

図10Dは、本方法の引き続く工程を示しており、この工程は一体化した試薬／血液分離層110の形成である。この層は、窓108を覆って設置し、窓108の側面全体に沿って絶縁層106上に延びている。層110印刷に適する組成物は、下記組成を有し、約6の緩衝pHを有する一体化した試薬／血液分離層を提供する：

#### 【0046】

成 分	量
アナラー水 (Analar Water)	3L
クエン酸三ナトリウム	15.75g
Nat 250 G	150g
クエン酸	6.3g
ポリ ビニルアルコール	30g
DC 1500 消泡剤	15 ml
カボシル (Cabosil)	225 g
グルコースオキシダーゼ	48g
カリウム Hex/60299	660g
PVPVA	30g

#### 【0047】

一体化した試薬／血液分離層110の形成後、メッシュ層111を、試験用細片の試料採取領域を覆って設置する(図10E)。このメッシュ111は、当該メッシュを親水性にするために、アセトンおよびフルオラド (Fluorad) FC170C 界面活性剤により予備処理されているナイロンメッシュである。このメッシュ111の目的は、液状試料が作用電極と対照電極との間の帯域を均一に通過して輸送することにある。

第二の絶縁層112を次いで、僅かにさらに柔軟性の絶縁性インキ (ERCON 絶縁層820202) を用いて形成し、試料採取領域を限定する(図10F)。次いで、

トップカバー 113 を、例 2 で上記したとおりに試験用細片の最表面上に適用し、仕上げられた試験用細片を形成する（図 10 G）。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 A および 1 B は、本発明による使い捨て試験用細片に有用な電極の構造を示す。

【図 2】

図 2 は、本発明による試験用細片を示す。

【図 3】

図 3 A ～ 3 C は、3 種の相違するヘマトクリットレベルについて、グルコース濃度の関数として測定された電流を示す。

【図 4】

図 4 は、測定された電流のグルコース濃度依存性の関係をヘマトクリットの関数として示す。

【図 5】

図 5 A ～ 5 C は、3 種の相違する導電性素子について、測定された電流を血液および対照溶液中のグルコースの関数として示す。

【図 6】

図 6 A および 6 B は、2 種の相違する温度でグルコースの関数として測定された電流を示す。

【図 7】

図 7 は、本発明によるグルコース試験用細片のもう一つの態様を示す。

【図 8】

図 8 A および 8 B は、本発明による試験用細片および市販のカーボンを基材とする試験用細片を用いて見出された電流過渡を示す。

【図 9】

図 9 A ～ 9 C は、本発明による試験用細片の 3 工程製造方法を示す。

【図 10】

図 10 A ～ 10 G は、本発明による試験用細片の製造を示す。

【図1A】

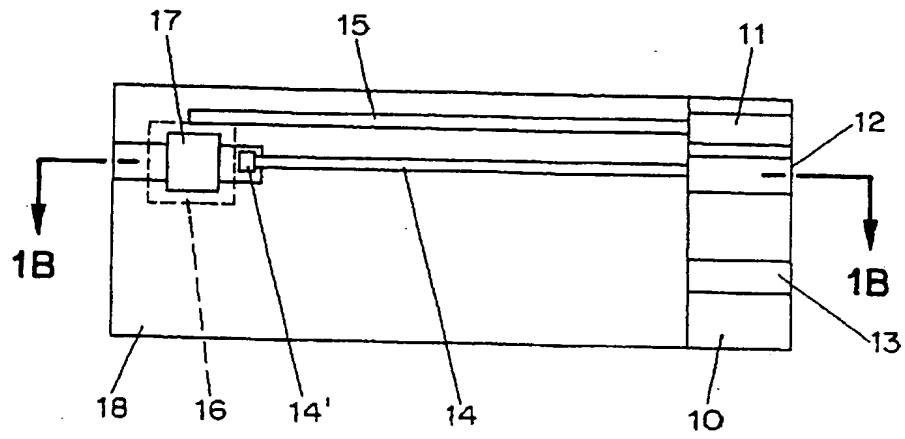


FIG. 1A

【図1B】

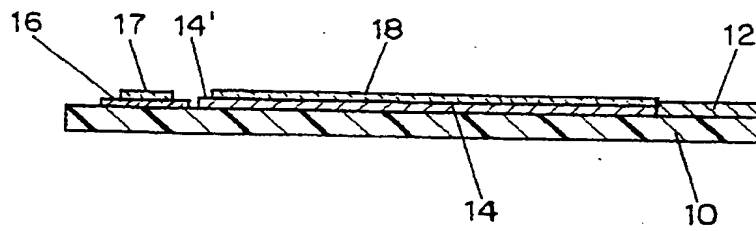


FIG. 1B

【図2】

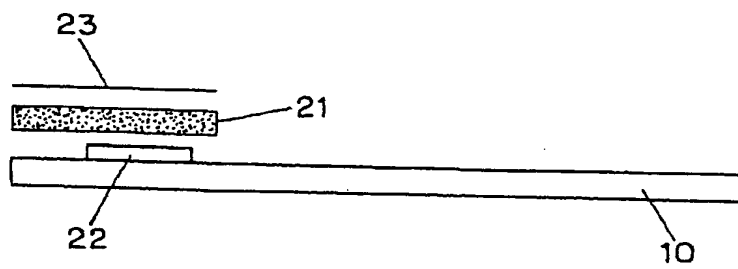
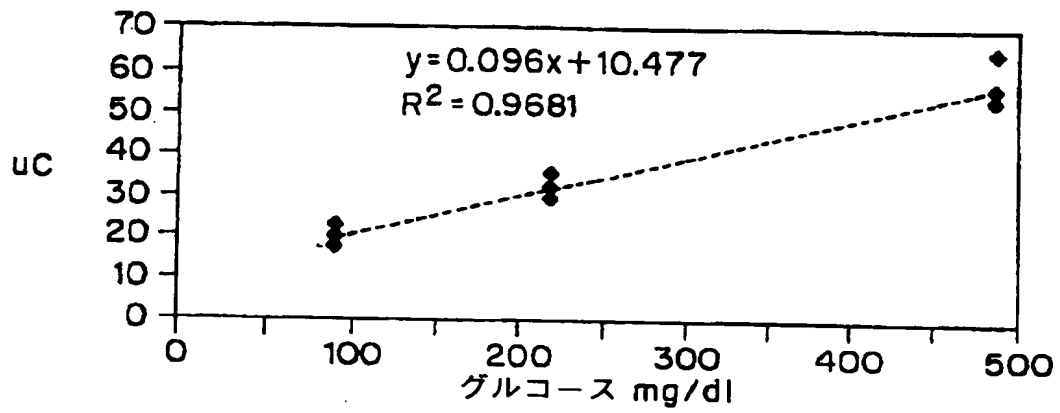
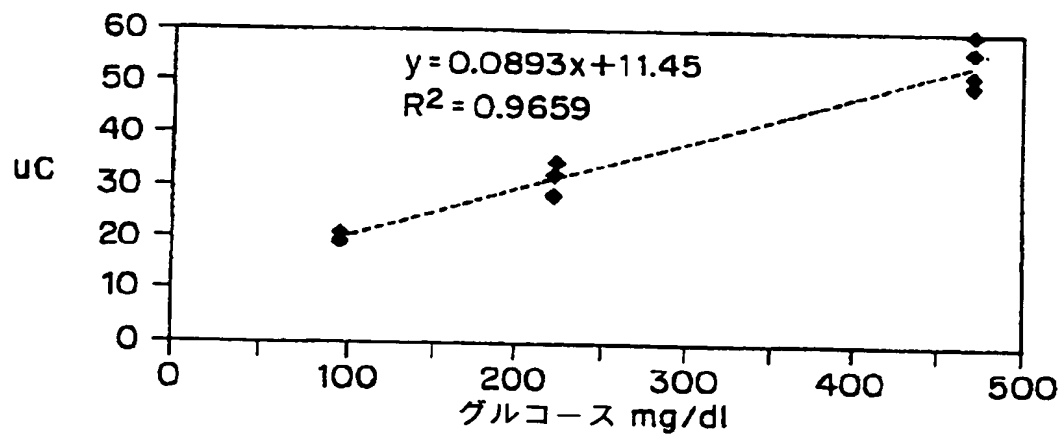


FIG. 2

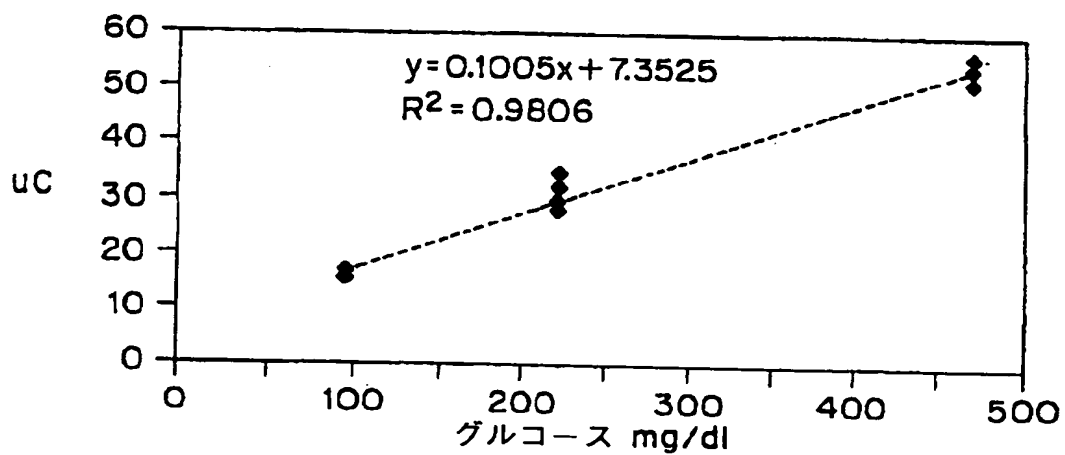
【図3】



A



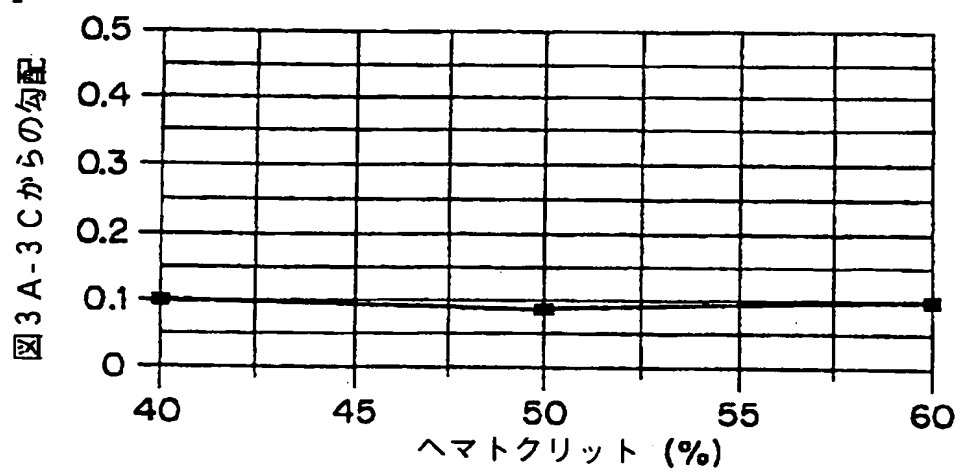
B



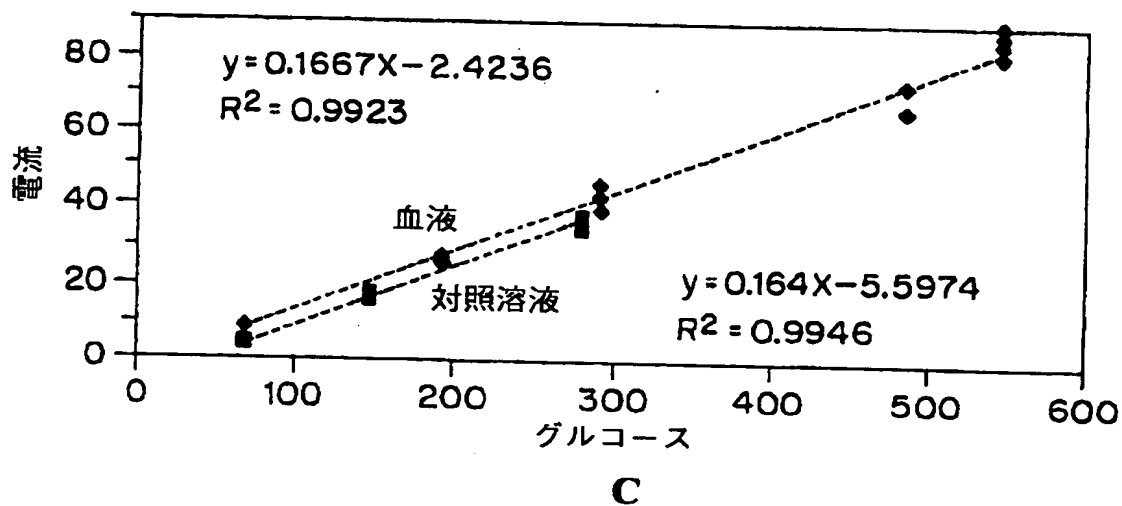
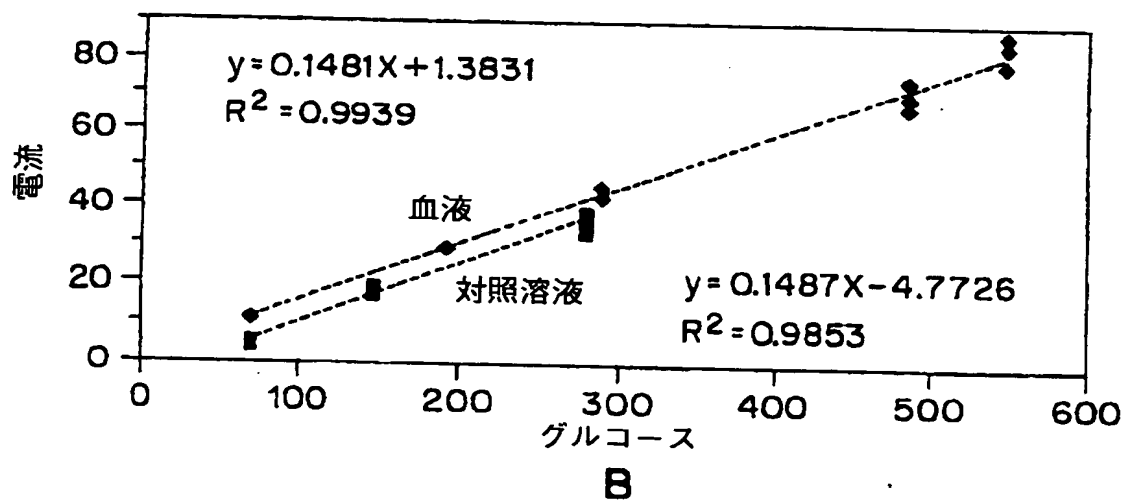
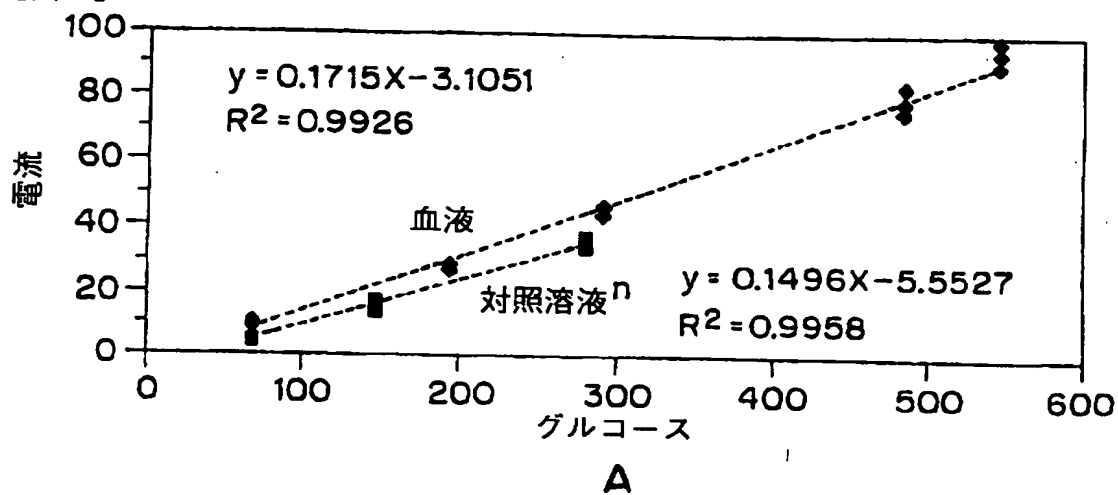
C



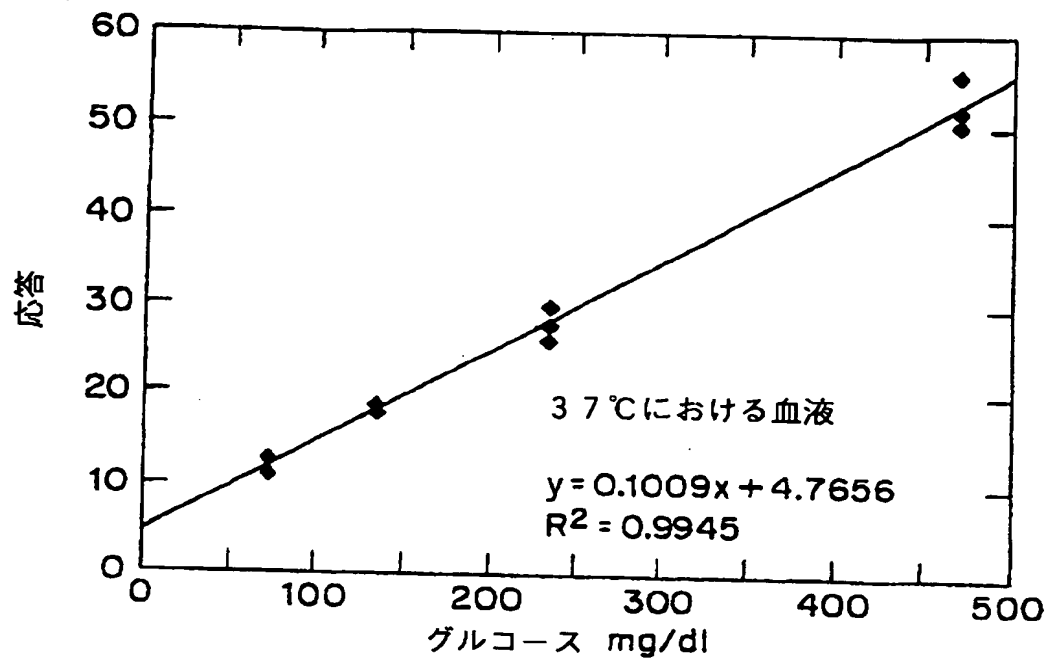
【図4】



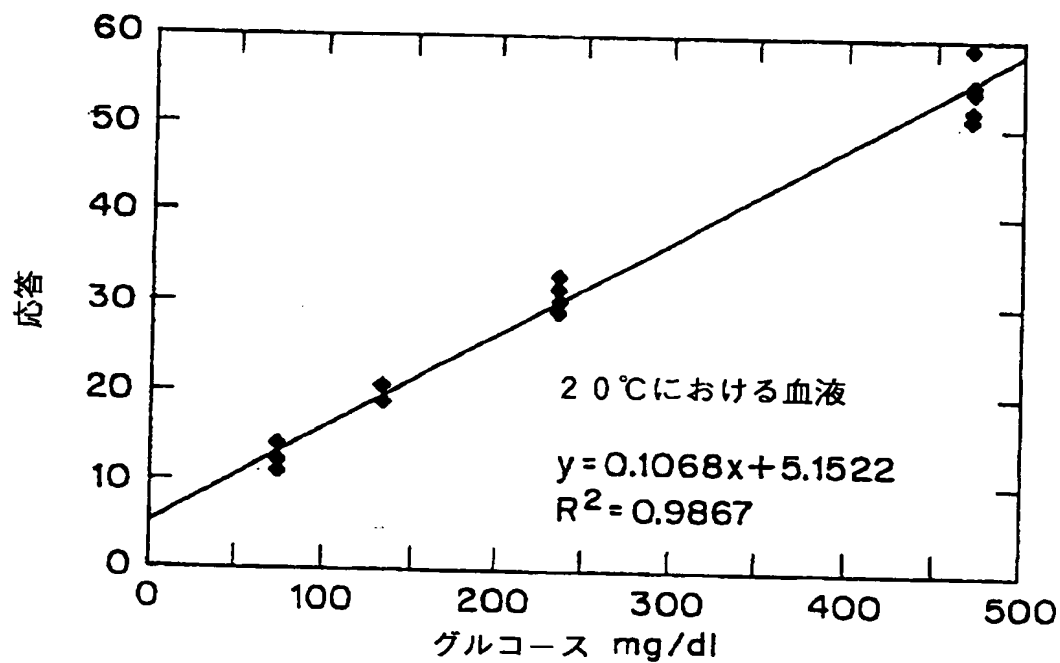
【図5】



【図6】



A



B

【図7】

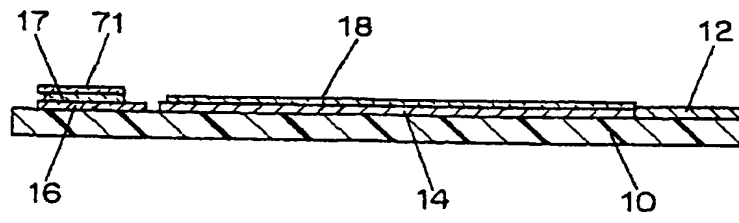
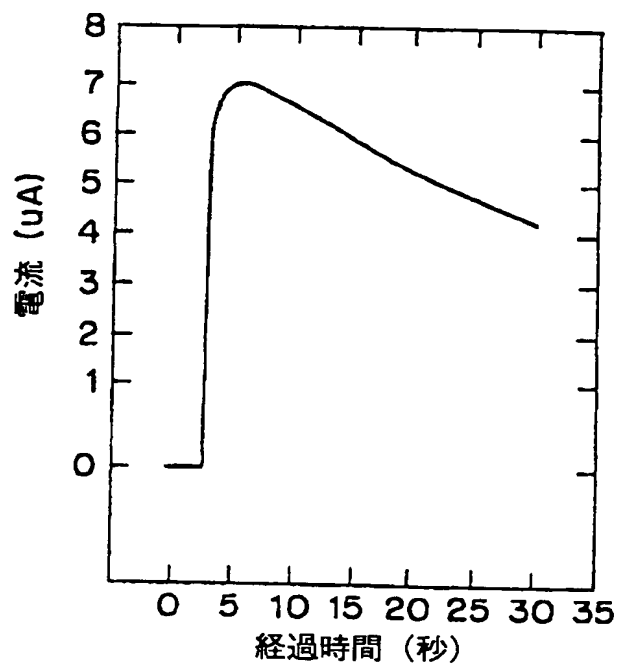
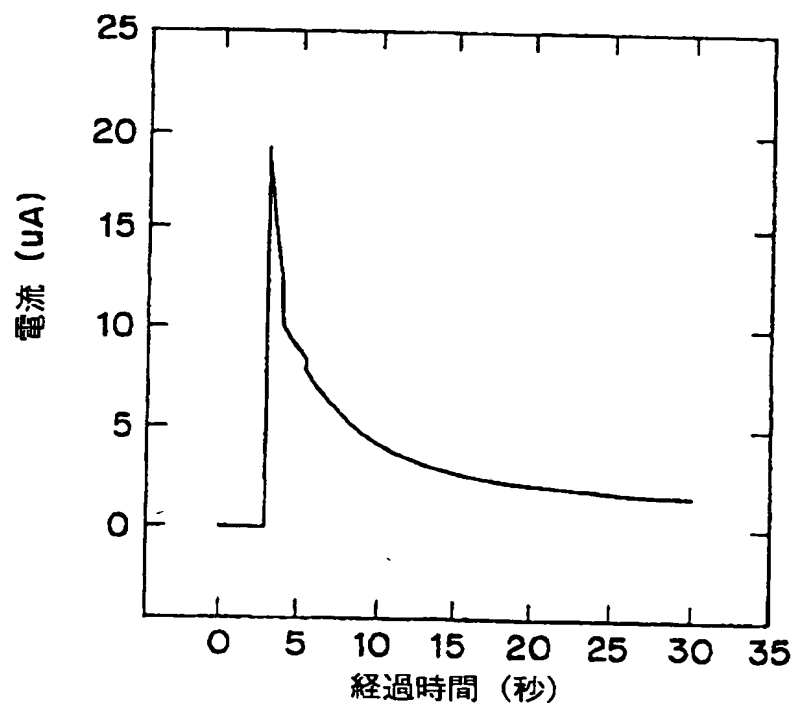


FIG. 7

【圖 8】

**A****B**

【図9A】

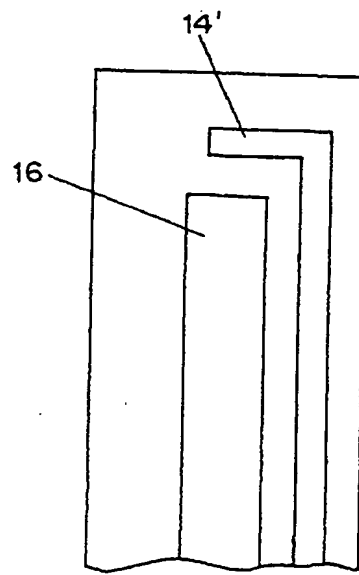


FIG. 9A

【図9B】

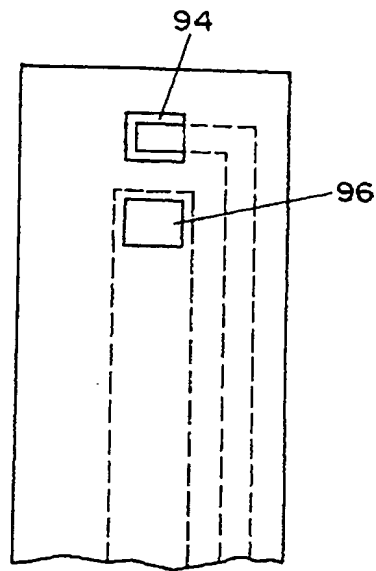


FIG. 9B

【図9C】

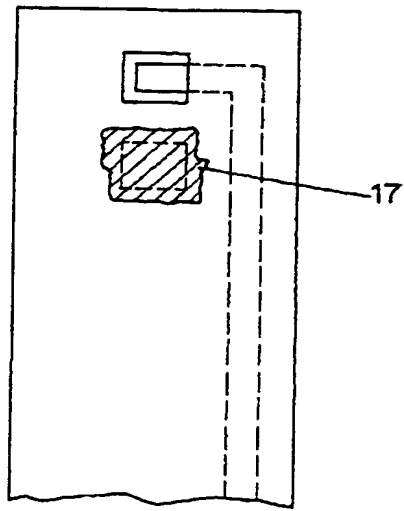


FIG. 9C

【図10A】

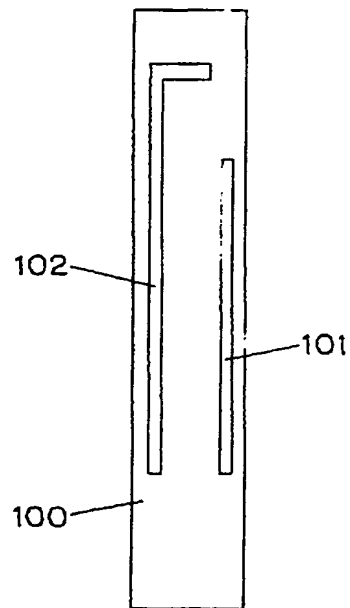


FIG. 10A

【図10B】

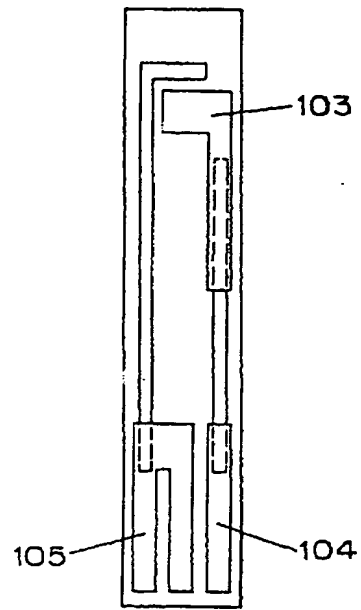


FIG. 10B

【図10C】

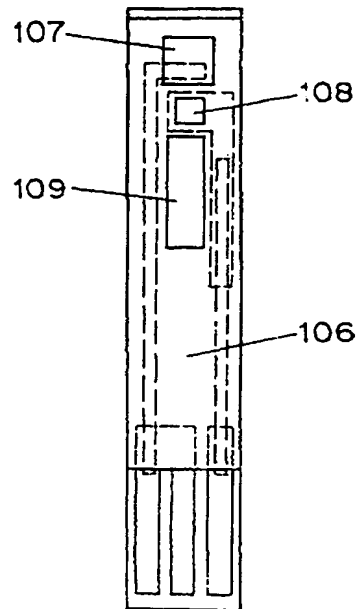


FIG. 10C



【図10D】

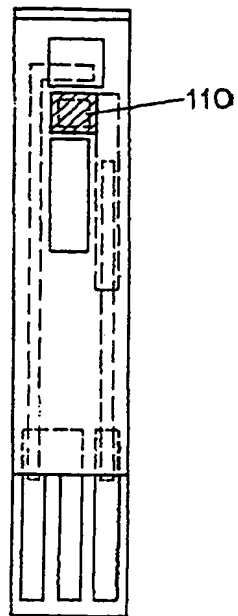


FIG 10D

【図10E】

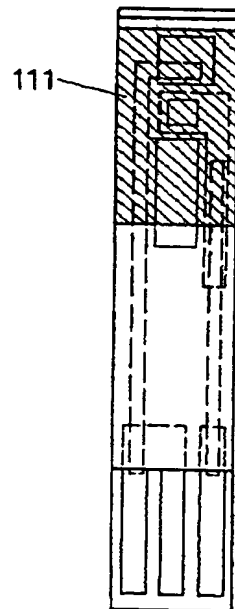


FIG. 10E

【図10F】

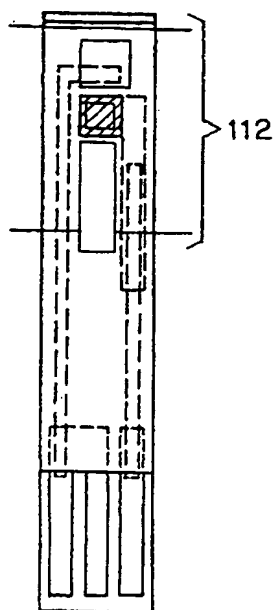


FIG. 10F

【図10G】

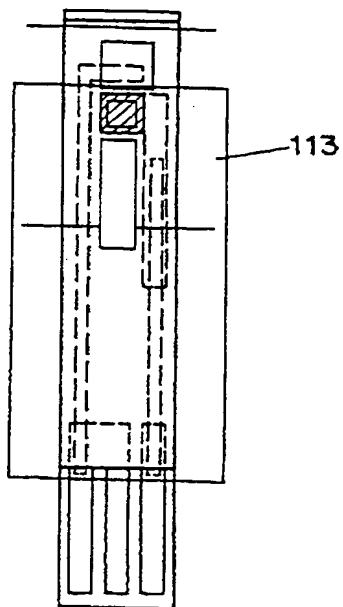


FIG. 10G

【手続補正書】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【提出日】平成12年10月4日(2000.10.4)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項1】 使い捨て試験用細片および血液試料を受容し、試料中の血液アナライトの量の電気化学的分析を行う形式のテストメーターで用いられる使い捨て試験用細片であって、

- (a) 基体；
  - (b) 基体上に配置されている第一導電性素子；
  - (c) 基体上に、第一導電性素子に十分に近接して配置されている第二導電性素子であって、これにより血液試料が試験用細片上に置かれると、第一導電性素子と第二導電性素子との間の電気回路を完成させることができる第二導電性素子；
  - (d) 第一導電性素子を覆って配置されている非導電性の一体化した試薬／血液分離層であって、可溶性電気活性成分により第一導電性素子に接近することを可能にしながら、血液細胞を第一導電性素子の表面から排除するのに有効な非導電性マトリックス中に分散されているアナライトを電気化学的に検出するための試薬を含有する非導電性の一体化した試薬／血液分離層；
  - (e) 第一および第二導電性素子とテストメーターとの間を電氣的に接続するコンタクト；および
  - (f) 少なくとも第一導電性素子を覆って配置されており、第一導電性素子と整合している第一開口部をそこに有する絶縁層；
- を含み、ここで上記非導電性の一体化した試薬／血液分離層は絶縁層に存在する開口部を経て第一導電性素子と接触し、また上記非導電性の一体化した試薬／血液分離層は第一開口部全体を覆っており、これにより第一導電性素子の試験用細片に適用された試料に直接にさらされる部分が残らないようにされている、上記使い捨て試験用細片。

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US00/00620

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(6) : G01N 27/26

US CL : 204/403

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 204/403, 415; 205/777.5, 778; 427/2.11, 2.12, 2.13

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS

search terms: sensor, detector, test strip, oxidase, glucose, blood, silica?, cab-o-sil

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0207370 A2 (JONES) 07 January 1987, the abstract; claims 2, 5, and 8; and page 6, line 5 - page 7, line 29.	1-23
Y	US 5,185,256 A (NANKAI et al.) 09 February 1993, the abstract and Figures 3 and 8.	1-23
Y	US 5,601,694 A (MALEY et al) 11 February 1997, the abstract; Figures 9A and 9B; col. 17, ll. 46-63; col. 19, ln. 34-45; col. 22, ll. 43-48; and col. 17, ln. 46 - col. 18, ln. 46.	1-23

<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents:	
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
*B* earlier document published on or after the international filing date	*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	*A* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 30 MARCH 2000	Date of mailing of the international search report 25 APR 2000
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer ALEX NOGUEROLA DEBORAH THOMAS PARALEGAL SPECIALIST Telephone No. (703) 308-0661

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7

識別記号

F I

テ-マコード (参考)

G 0 1 N 27/46

3 3 8

(81) 指定国 EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 ホール、ジェオフ

イギリス国 インバネス、ブリッジ ハウス リソーリー

(72) 発明者 アルバレス - イカザ、マヌエル

イギリス国 インバネス、リーイ ストリート 3シー

(72) 発明者 プロトキン、エリオット、ファイ

イギリス国 インバネス、ブロードストーン パーク 25

(72) 発明者 デービス、オリバー、ダブリュ、エイチ

イギリス国 インバネス、ドラモンド サーラス 15

Fターム (参考) 2G045 AA13 AA25 BB03 CA25 DA31

FB01 FB05 FB15